

## イネにおけるNADHグルタミン酸合成酵素反応への2-オキソグルタル酸供給系に関する研究

著者	安彦 友美
号	846
発行年	2005
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16172">http://hdl.handle.net/10097/16172</a>

氏 名(本籍)	あ 安      びこ 彦      とも 友      み 美
学 位 の 種 類	博 士 ( 農 学 )
学 位 記 番 号	農 博 第 8 4 6 号
学位授与年月日	平 成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)
学 位 論 文 題 目	イネにおける NADH グルタミン酸合成酵素反応への 2- オキシグルタル酸供給系に関する研究
論文審査委員	(主 査) 教 授 山 谷 知 行 (副 査) 教 授 前 忠 彦 教 授 池 上 正 人

# 論文内容要旨

## 序論

高等植物にとって、窒素はその成育や生産性を大きく左右する栄養素の一つである。植物は、主にグルタミン合成酵素 (GS) / グルタミン酸合成酵素 (GOGAT) サイクルによって、根から吸収した無機態窒素を有機化する。無機態窒素の同化過程で、GOGAT は、アミノ基を受容する炭素骨格として 2-オキシグルタル酸 (2-OG) を必要とすることから、窒素代謝と炭素代謝の接点に位置している重要な反応を触媒する酵素である。

GOGAT には、電子供与体を異にするフェレドキシン依存性 GOGAT (Fd-GOGAT) と NADH 依存性 GOGAT (NADH-GOGAT) の少なくとも 2 つの分子種が存在することが知られている。緑葉の GOGAT の主成分である Fd-GOGAT の研究は進んでおり、葉緑体に存在し、オオムギやシロイヌナズナの突然変異体を用いた実験結果より、光呼吸経路から放出される  $\text{NH}_4^+$  の再同化を担うことが示されている。この際の 2-OG は、ペルオキシソームでのグルタミン酸グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼによることが示唆されている。一方、NADH-GOGAT の生理的役割については、特にイネを用いた解析結果が多数報告されている。窒素代謝系酵素遺伝子の中では、NADH-GOGAT 遺伝子の発現は、1) 空間的、2) 時間的、3) 窒素に応答した特異性をもつ大きな特徴がある。幼植物の根において、*NADH-GOGAT* mRNA 量は  $\text{NH}_4^+$  添加後短時間で増加し、また、NADH-GOGAT タンパク質は  $\text{NH}_4^+$  添加 24 時間後には根の表皮・外皮細胞に顕著に集積する。地上部では、若い葉身や登熟初期の穎果など成長中の器官に特異に多く蓄積しており、物質の転流経路である維管束組織に主に局在している。このことから、NADH-GOGAT は、根における  $\text{NH}_4^+$  の同化過程や、若い葉身や登熟初期の穎果における窒素の再利用など、生理的に重要な役割を担っていることが示唆されている。しかし、NADH-GOGAT への 2-OG の供給系については、2-OG を生成する酵素が複数挙げられるにとどまっており、酵素の特定には至っていない。

本研究では、イネの NADH-GOGAT 遺伝子の発現特異性を基盤として、NADH-GOGAT 反応に 2-OG を供給する主経路を明らかにすることを目的とした。NADH-GOGAT 反応に 2-OG を供給する候補の酵素として、NAD イソクエン酸脱水素酵素 (IDH)、NADP イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH)、NAD(H) グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) に着目して解析を行った。第一章では、IDH、ICDH、GDH に関する分子資材の獲得と検証結果について述べた。第二章では、根における  $\text{NH}_4^+$  の初期同化過程について、第三章では、若い葉身や登熟穎果について焦点をあて、IDH、ICDH、GDH の発現特性を解析した。得られた結果を基に、根、若い葉身、そして、登熟初期の穎果における NADH-GOGAT 反応に 2-OG を供給する経路について、生理学的考察を行った。

## 第一章 IDH、ICDH、GDH に関する分子資材の獲得と検証

分子生物学的手法を用いて対象とする酵素の生理機能の解析を行うため、まず分子資材の獲得を行った。本章では、イネの IDH 遺伝子 (*OsIDH*)、ICDH 遺伝子 (*OsICDH*)、及び GDH 遺伝子 (*OsGDH*) の cDNA、並びに、各々のタンパク質を特異に認識する抗体など、分子資材を調整することを目的とした。

TCA サイクルの構成酵素である IDH の研究が進んでいるタバコでは、*NtIDHa*、*NtIDHb*、*NtIDHc* の 3 種の cDNA が単離されている。酵母を用いた相補実験により、*NtIDHa* は触媒機能、*NtIDHb*、*NtIDHc* は調節機能を有することが示されている。*NtIDH* の配列を基に、イネのデータベースを用いて検索した結果、*NtIDHa* と高い相同性を示す *OsIDHa* と、*NtIDHc* と高い相同性を示す *OsIDHc;1*、*OsIDHc;2* が見出され、cDNA の単離を行った。また、大腸菌内にて大量発現させた *OsIDHa* をウサギに免疫して抗 *OsIDHa* 抗体を作製した。作製した抗体は、*OsIDHa* に特異な抗体であることがイミュノブロット法により確認された。しかし、免疫組織化学的解析に用いるほどの高い特異性を保持していなかったため、パリ大学の Michael Hodges 博士によりタバコの抗 IDHa 抗体を分譲していただき、イネの IDHa に対する特異性を確認後、免疫組織化学的解析に供した。

タバコやシロイヌナズナにおける ICDH は、細胞内のサイトソル、プラスチド、ミトコンドリア、ペルオキシソームに局在しており、複数のアイソザイムが存在することが知られている。多くの植物種において全 ICDH 活性の大半はサイトソル型 ICDH が占めることが示されている。イネのデータベースを検索した結果、イネにおいても 4 つの *OsICDH* 遺伝子 [*OsICDH1* (*cytosolic*), *OsICDH2* (*cytosolic*), *OsICDH* (*mitochondrial/plastidic*), *OsICDH* (*peroxisomal*)] が見出された。これらの ICDH の遺伝子群の推定アミノ酸配列は、相互に高い相同性を示した。大腸菌内にて大量発現させた *OsICDH1* 発現タンパク質をウサギに免疫して、抗 *OsICDH1* 抗体を作製した。作製した抗体の特異性をイミュノブロット法により検証した結果、*OsICDH1* の推定分子質量 46kDa の位置に単一なバンドが検出された。しかし、ICDH には 4 分子のアイソザイムが存在し、アミノ酸配列の相同性も相互に極めて高く、分子量も類似していることから、4 分子の ICDH を識別していない可能性が高く、免疫組織化学的解析に供試するには適していないと判断した。

GDH は、2-OG とアンモニウムを生成する脱アミノ化反応と、2-OG とアンモニウムからグルタミン酸を生成するアミノ化反応とを可逆的に触媒する酵素である。GDH 遺伝子は、イネにおいて、*OsGDH1*、*OsGDH2*、*OsGDH3* の 3 種の cDNA が潮田らにより単離されている。抗 GDH 抗体は、トウモロコシの抗 GDH 抗体を用いて、イミュノブロット法および免疫組織化学的解析に供した。

## 第二章 幼植物の根における窒素の初期同化過程への 2-OG 供給系についての解析

幼植物の根において、*NADH-GOGAT* mRNA 量は、 $\text{NH}_4^+$ 添加後短時間で激的に増加する。また、*NADH-GOGAT* タンパク質は、 $\text{NH}_4^+$ 添加 24 時間後には、根の先端の表層細胞において、顕著に集積することが示されており、 $\text{NH}_4^+$ の同化過程で重要な役割を担っていることが示唆されている。対象としている酵素の発現特性や組織局在性を明らかにすることは、その生理的役割を解明するために有効な研究方法の一つであると考えられる。IDH、ICDH、GDH のいずれかの酵素が、 $\text{NH}_4^+$ の添加に伴い *NADH-GOGAT* と類似した発現特性を示すならば、*NADH-GOGAT* 反応に 2-OG を供給する酵素の特定が期待される。本章では、幼植物の根における窒素添加に伴う IDH、ICDH、GDH の発現特性、並びに、組織局在性について解析し、*NADH-GOGAT* への 2-OG の供給系を解明することを目的とした。

播種後 17 日目の種子栄養が枯渇したイネを、1mM  $\text{NH}_4^+$ を含む 1/4 強度の水耕液にて育成することで、 $\text{NH}_4^+$ 処理を行った。その結果、根における *NADH-GOGAT* mRNA 蓄積量は、 $\text{NH}_4^+$ を添加した 3 時間後に増加していた(Fig.1A)。 *OsIDHa* 及び *OsIDHc;1* mRNA の蓄積の変化は、*NADH-GOGAT* mRNA の蓄積の変化と類似していた(Fig.1B, C)。 *OsGDH1* 及び *OsGDH2* mRNA の蓄積量は、 $\text{NH}_4^+$ 添加に伴って増加するものの、*NADH-GOGAT* mRNA の蓄積量の変化とは異なっていた(Fig.1C)。一方、*OsICDH* 遺伝子群に関しては、 $\text{NH}_4^+$ 添加に伴う変化は認められなかった(Fig.1D)。次に、 $\text{NH}_4^+$ 添加に対する各遺伝子の蓄積部位を調べるため、約 13cm の冠根を根軸に沿って 4 つに等分割して供試した。その結果、根端から 3.25-6.5cm の部位で、 $\text{NH}_4^+$ 添加に伴い、*OsIDHa*、*OsIDHc;1* mRNA 量は、*NADH-GOGAT* mRNA 量とともに顕著に増加蓄積することが明らかとなった(Fig.2A, B, C)。一方、*OsGDH1*、*OsGDH2* mRNA 量は、*NADH-GOGAT*とは異なる部位で主に増加した(Fig.2A, D, E)。根における IDHa、GDH、*NADH-GOGAT* タンパク質含量は、 $\text{NH}_4^+$ 添加 24 時間後には顕著に増加していた(Fig.3)。さらに、*NADH-GOGAT* の局在性が判明している根の先端に着目して、IDHa 及び GDH タンパク質が  $\text{NH}_4^+$ 添加に伴って蓄積する組織を免疫組織化学的手法により同定した。その結果、 $\text{NH}_4^+$ の添加に伴い、IDHa タンパク質は、伸長帯の表皮・外皮の細胞において顕著に集積し、著しい組織局在性の変化を示した(Fig.4A, B)。一方、 $\text{NH}_4^+$ 添加による GDH タンパク質の局在性の変化は認められなかった(Fig.5A, B)。

IDH は、 $\text{NH}_4^+$ の添加後の mRNA 及びタンパク質の蓄積の挙動や、 $\text{NH}_4^+$ の添加に伴って蓄積する組織が *NADH-GOGAT* と類似していることが判明した。以上の結果より、根における  $\text{NH}_4^+$ の初期同化過程で、IDHa が *NADH-GOGAT* 反応に 2-OG を供給している可能性が高いことが示された。

### 第三章 イネの葉身と穎果における IDH、ICDH 及び GDH の発現特性

イネの NADH-GOGAT タンパク質は、未抽出葉身や登熟初期の穎果など、成長中の組織に特異的に多く蓄積していることが報告されている。未抽出葉身においては主に維管束柔細胞群及びメストム鞘細胞に、登熟過程の穎果においては主に背部大維管束組織の柔細胞群、珠心突起細胞及び珠心表皮細胞などの、物質の転流に関わる細胞群に局在していることが示されている。このことから、NADH-GOGAT は、若い組織において、転流窒素の主形態であるグルタミンをグルタミン酸に変換する役割を担っていることが示唆されている。しかし、これらの細胞群における NADH-GOGAT への 2-OG の供給系については判明していない。本章では、未抽出葉身や登熟初期の穎果における NADH-GOGAT 反応に 2-OG を供給する主経路を解明することを目的とし、IDH、ICDH、GDH の発現特性を明らかにした。得られた結果と NADH-GOGAT の知見を基に比較することで、NADH-GOGAT への 2-OG の供給系について考察を行った。

ガラス室で水耕法により栽培した日本晴を供試材料とし、8.5 葉期の主稈の第 5 葉から第 10 葉身を収穫した。この時点において、第 10 葉身は未抽出であった。発達段階が異なる葉身における、IDHa、ICDH、GDH 及び NADH-GOGAT タンパク質の蓄積について解析した。その結果、IDHa、ICDH、GDH タンパク質は、第 10 未抽出葉身と第 9 葉の未抽出部位で多く蓄積しており、NADH-GOGAT タンパク質の蓄積様式と類似していることがわかった(Fig.6)。さらに、免疫組織化学的手法により、NADH-GOGAT の組織局在性が判明している未抽出葉身における IDHa 及び GDH の組織局在性を同定した。第 10 未抽出葉身における IDHa タンパク質は、主に維管束柔細胞群、篩部伴細胞、及び、メストム鞘細胞に局在していた(Fig.7A)。一方、GDH タンパク質は、篩部柔細胞及び篩部伴細胞に主に局在していた(Fig.7B)。

開花日、開花後 5、10、15、20、35 日目の穎果を対象として、IDHa、ICDH、GDH 及び NADH-GOGAT タンパク質の蓄積の挙動について解析した。IDHa、ICDH 及び GDH タンパク質は、主に開花日と開花後 5 日目に多く蓄積していた(Fig.8)。一方、NADH-GOGAT タンパク質は開花後 10、15 日に増加していた。開花後 7 日の穎果における IDHa、GDH タンパク質の局在性は、ともに物質の転流経路である背部大維管束組織に主に局在していた(Fig.9)。

未抽出葉身や登熟過程の穎果において、NADH-GOGAT が局在する細胞群において、IDHa や GDH タンパク質も局在していた。現時点では、IDH、ICDH、GDH のすべての酵素も NADH-GOGAT 反応に 2-OG を供給する可能性があり、主経路の特定には至らなかった。

## 結論

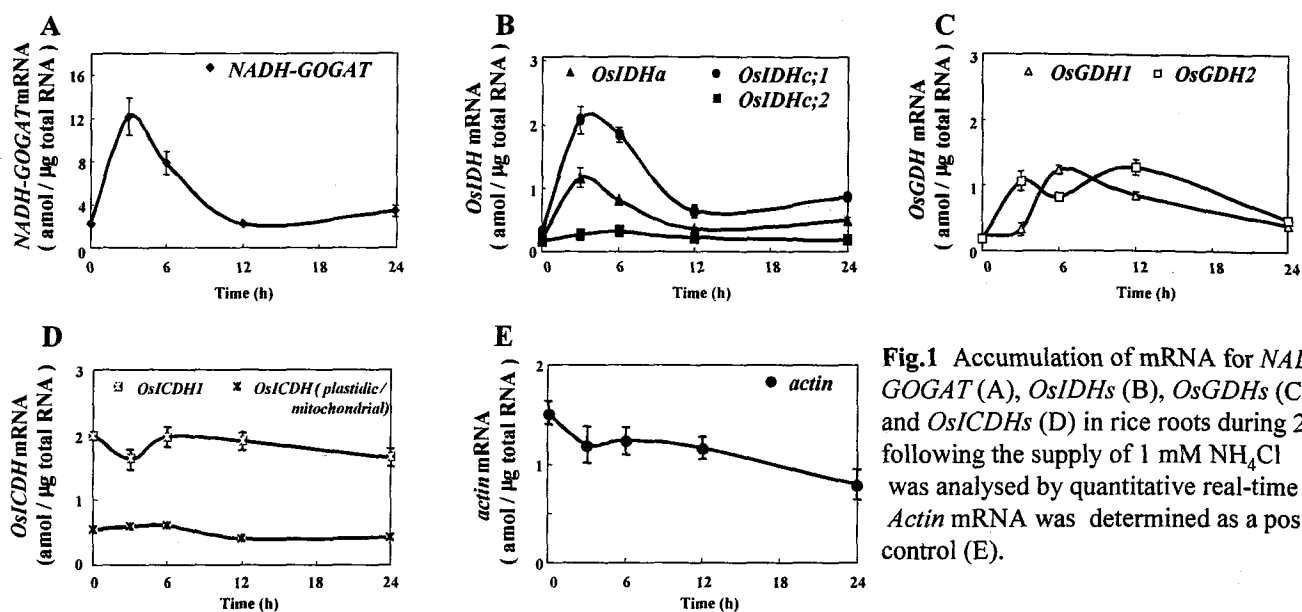
本博士論文において、以上のことが明らかとなった。

1. IDH は、根における  $\text{NH}_4^+$  添加後の mRNA 及びタンパク質の蓄積パターンや、 $\text{NH}_4^+$  添加に伴って蓄積する組織が NADH-GOGAT と類似していることが示された。つまり、吸収した  $\text{NH}_4^+$  の初期同化過程において、IDH が NADH-GOGAT 反応に 2-OG を供給している可能性が高いことが示された。

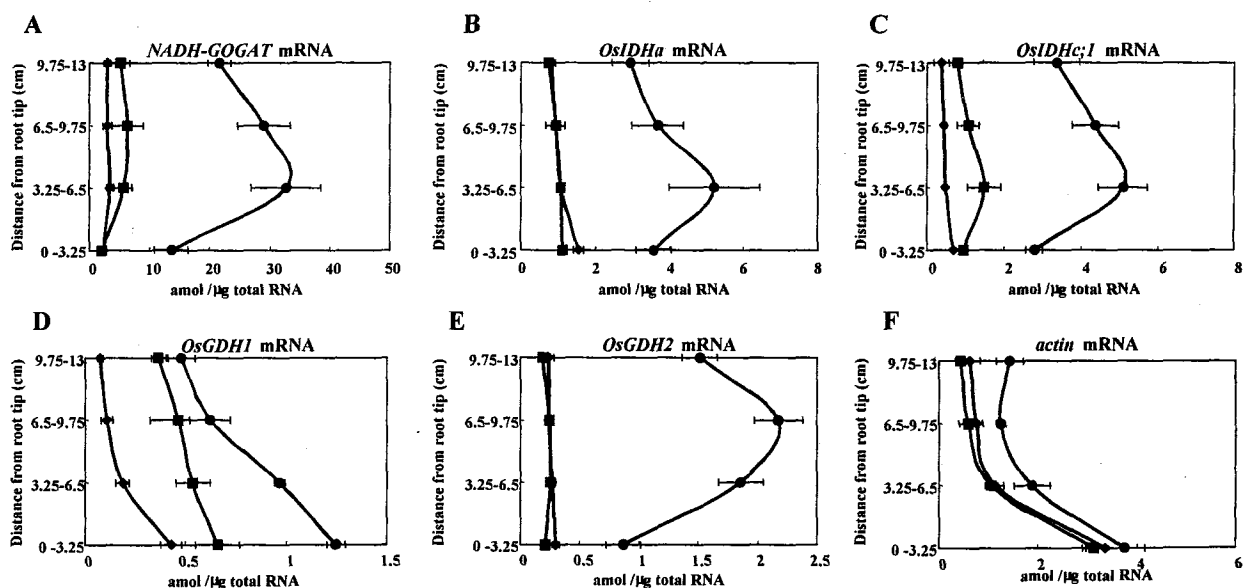
2. 未抽出葉身や登熟過程の穎果において、IDHa や GDH タンパク質は、NADH-GOGAT が局在する細胞群においても局在していた。現段階では、IDH、ICDH、GDH のいずれの酵素が NADH-GOGAT 反応に 2-OG を供給しているか、明確な結果は認められておらず、今後の検討が更に必要である。

## 原著論文

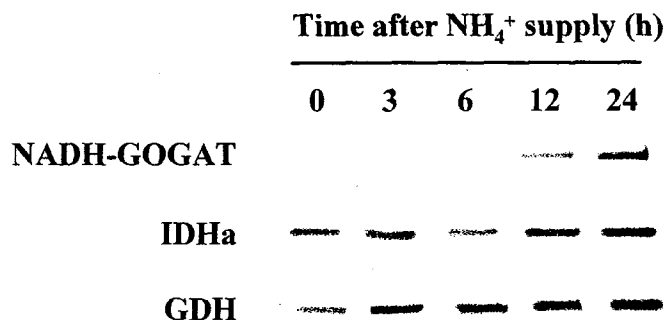
Abiko T, Obara M, Ushioda A, Hayakawa T, Hodges M and Yamaya T (2005)  
Localization of NAD-isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in rice roots : Candidates for providing carbon skeletons to NADH-glutamate synthase.  
*Plant Cell Physiol.* 46 (10) : 1724-1734.



**Fig.1** Accumulation of mRNA for *NADH-GOGAT* (A), *OsIDHs* (B), *OsGDHs* (C) and *OsICDHs* (D) in rice roots during 24 h following the supply of 1 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was analysed by quantitative real-time PCR. *Actin* mRNA was determined as a positive control (E).

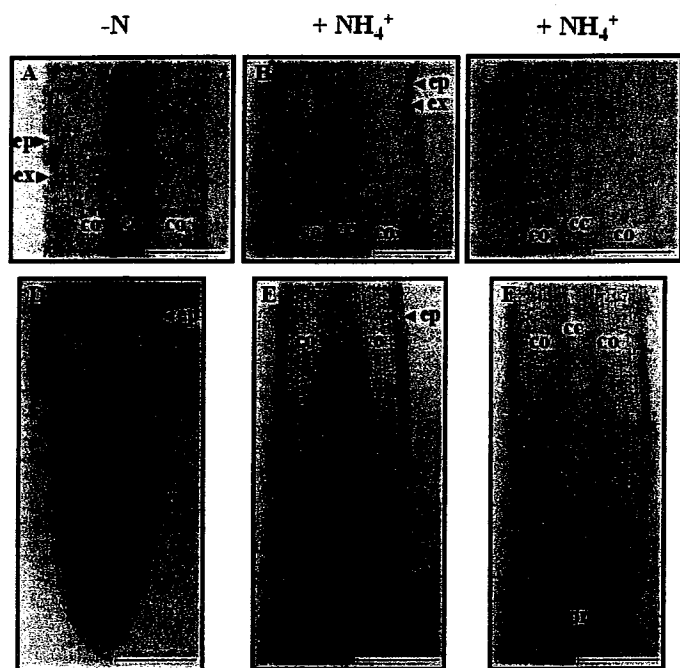


**Fig. 2** Accumulation of mRNA for *NADH-GOGAT* (A), *OsIDHa* (B), *OsIDHc1* (C), two *OsGDHs* (D, E) along 13-cm-long crown roots of rice seedlings before the treatments (◆) and after the supply of 0 mM (■) or 1 mM (●)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 3 h. Sequential segments were taken by dividing the roots into quarters. *Actin* mRNA (F) levels were determined as positive control.

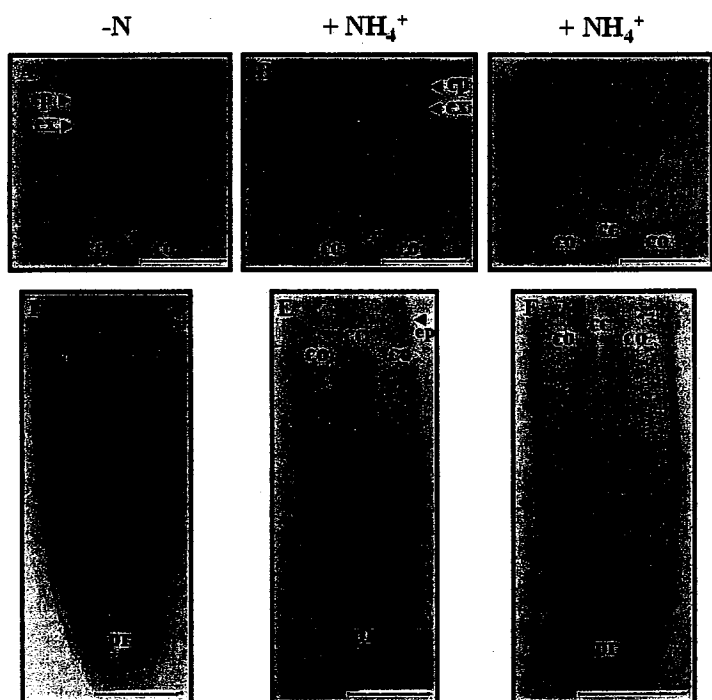


**Fig. 3** Immunodetection of *NADH-GOGAT*, *IDHa* and *GDH* proteins in rice root extracts. Samples were taken at 0, 3, 6, 12 and 24h following the supply of 1 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Soluble root proteins (10  $\mu$ g for *NADH-GOGAT* and 4  $\mu$ g for *IDHa* and *GDH*) were separated by SDS-PAGE before immunoblotting.

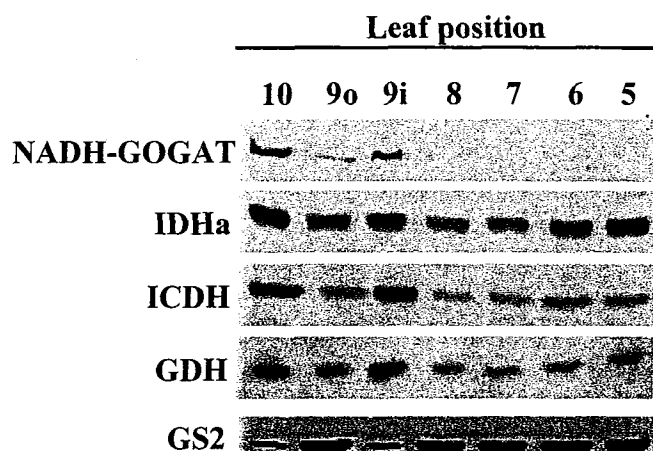




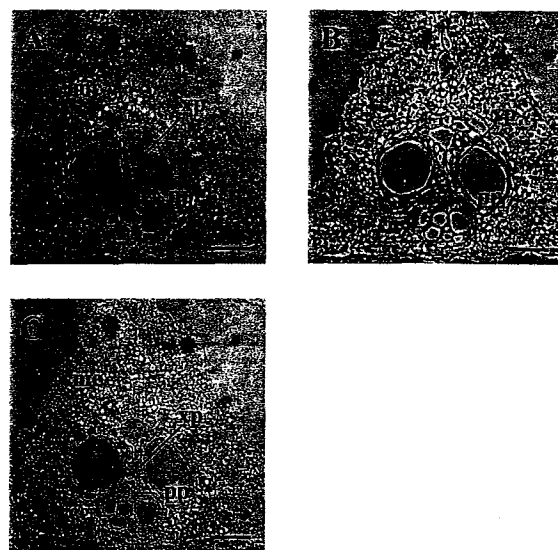
**Fig. 4** Cellular localization of IDHa protein in the elongation zone of rice roots (**A, B**) and root tips (**D, E**). (**A, D**) Longitudinal section of a root supplied with 0 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (-N). (**B, E**) Longitudinal section of a root supplied with 1 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (+ $\text{NH}_4^+$ ) for 24 h. (**C, F**) Control longitudinal section of a root supplied with 1 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 24 h treated with normal rabbit antiserum. cc, central cylinder; co, cortex; ep, epidermis; ex, exodermis; pr, plerome. Bars = 100  $\mu\text{m}$ .



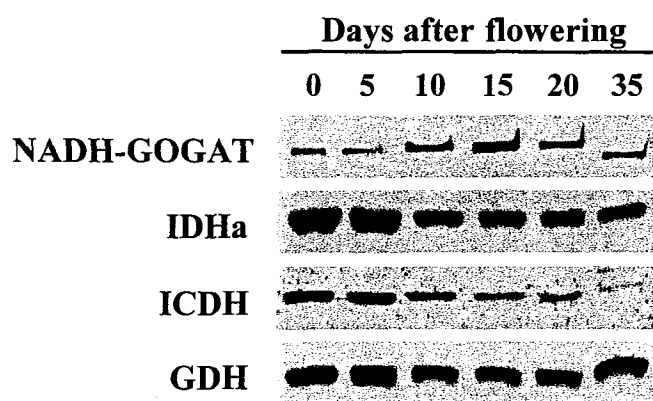
**Fig. 5** Cellular localization of GDH protein in the elongation zone of rice roots (**A, B**) and root tips (**D, E**). (**A, D**) Longitudinal section of a root supplied with 0 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (-N). (**B, E**) Longitudinal section of a root supplied with 1 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (+ $\text{NH}_4^+$ ) for 24 h. (**C, F**) Control longitudinal section of a root supplied with 1 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 24 h treated with normal rabbit antiserum. cc, central cylinder; co, cortex; ep, epidermis; ex, exodermis; pr, plerome. Bars = 100  $\mu\text{m}$ .



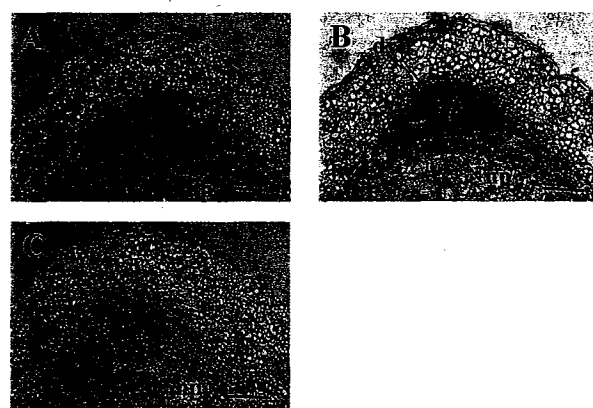
**Fig.6** Expression profiles of NADH-GOGAT, IDHa, ICDH, GDH and GS2 proteins in rice-leaf blades at various leaf positions. Soluble proteins (80  $\mu$ g for NADH-GOGAT, 26  $\mu$ g for ICDH and 13  $\mu$ g for IDHa, GDH and GS2) were separated by SDS-PAGE before immunoblotting.



**Fig.7** Cellular localization of IDHa, GDH protein in large vascular bundles of the 10th unexpanded leaf blade. (A) Stained with affinity-purified tobacco IDHa antibody. (B) Stained with maize GDH antibody. (C) Stained with normal rabbit antiserum. pp, phloem parenchyma cell; xp, xylem; parenchyma cell; cc, companion cell; mc, mesophyll cell. Bars = 30  $\mu$ m.



**Fig. 8** Changes in the contents of NADH-GOGAT, IDHa, ICDH and GDH proteins in rice spikelets during the ripening. Soluble proteins (30  $\mu$ g for NADH-GOGAT, 26  $\mu$ g for ICDH and 13  $\mu$ g for IDHa and GDH) were separated by SDS-PAGE before immunoblotting.



**Fig. 9** Cellular localization of IDHa, GDH proteins in young grain of rice. (A) Stained with affinity-purified tobacco IDHa antibody. (B) Stained with affinity-purified maize GDH antibody. (C) Stained with normal rabbit antiserum. dvb, dorsal vascular bundles; ne, nucellar epidermis; np, nucellar projection. Bars = 30  $\mu$ m.

## 論文審査結果要旨

植物における無機態窒素の同化は、成育や生産性を決定づける重要な機構である。世界三大作物の一つであるイネでは、根から吸収する無機態窒素の大部分をアンモニウムイオンに依存している。吸収されたアンモニウムイオンの多くは、根で直ちにグルタミン合成酵素とグルタミン酸合成酵素により同化される。グルタミン酸合成酵素の反応には、炭素骨格として 2- オキシグルタル酸を必要とするが、この重要な反応にもかかわらず、2- オキシグルタル酸の供給経路に関しては明らかになっていない。

本研究は、イネ根における NADH グルタミン酸合成酵素 (NADH-GOGAT) 遺伝子の組織特異的発現と窒素に応答する発現の特性に着目し、2- オキシグルタル酸供給系の候補遺伝子産物の発現解析を行い、炭素骨格供給経路を推定したものである。

得られた結果は、次のように要約できる。① 2- オキシグルタル酸生成系として、ミトコンドリアの NAD イソクエン酸脱水素酵素 (IDH) とグルタミン酸脱水素酵素 (GDH)、並びに 4 種の小遺伝子族を形成している NADP イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH) に着目し、それぞれの遺伝子、cDNA、並びに特異抗体を獲得した。②イネの根で NADH-GOGAT 遺伝子発現が正に制御される条件を設定し、候補遺伝子産物の挙動を比較解析した。③ IDH と GDH 抗体を用いて免疫組織学的な解析を行い、NADH-GOGAT タンパク質の局在と比較解析した。④イネの若い葉身や登熟初期の穎果における IDH、ICDH、GDH の遺伝子発現を解析し、NADH-GOGAT mRNA の挙動と比較した。⑤ RNAi 法により、ICDH 遺伝子の発現を抑制したノックダウン変異体を作成し、候補遺伝子の発現を追跡した。これらの結果から、イネの根では IDH mRNA や IDH タンパク質の挙動が NADH-GOGAT 遺伝子産物と極めて類似していることがはじめて判明し、上記の①から③の結果をまとめ、その成果を学術雑誌に公表した。

以上、本研究の成果は、窒素代謝と炭素代謝の接点に位置する NADH-GOGAT 反応に炭素骨格を供給する経路を探索したもので、この分野の理解を深めた。また、ノックダウン変異体を用いた解析は、世界に先駆けた研究であり、成果の公表を準備中である。

本研究は、今後の代謝間クロストーク機構の分子実体の解明に発展しうる基礎を構築した優れたものである。審査員一同は、本論文提出者に対し、博士(農学)の学位を授与するに値するものと認定した。